

Plaque angiogenesis and lymphangiogenesis : can small vessels influence atherosclerosis?

Citation for published version (APA):

Rademakers, T. (2013). *Plaque angiogenesis and lymphangiogenesis : can small vessels influence atherosclerosis?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress.
<https://doi.org/10.26481/dis.20130626tr>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20130626tr](https://doi.org/10.26481/dis.20130626tr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary



Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide, accounting for about 17 million deaths globally every year. The most prevalent cardiovascular diseases are acute myocardial infarction and stroke, which are mostly caused by occlusion of arteries as a result of rupture of advanced atherosclerotic plaques.

Atherosclerosis is a progressive, chronic inflammatory disease, characterized by accumulation of lipids, and cellular and fibrous constituents in the arterial tree at sites of disturbed flow. At these sites, LDL cholesterol enters the vessel wall, is modified, and elicits recruitment of monocytes to the vessel wall. These monocytes differentiate into macrophages, which take up the oxidized LDL, develop into foam cells, are rendered immobile, and as a result accumulate in the vessel wall. This causes a persistent inflammatory response in the vessel wall and, with time, the development of advanced atherosclerotic lesions with a necrotic and lipid-rich core which is covered by a fibrous cap. Production of several types of proteases, as well as cell death, and erosion will destabilize the fibrous cap, allowing the plaque to evolve to a rupture-prone plaque phenotype. Upon plaque rupture, the pro-thrombotic constituents of the necrotic core will come into contact with the blood, thus causing thrombus formation, and potentially causing acute myocardial infarction or stroke.

Angiogenesis, the development of new blood vessels, is also an important factor in atherosclerosis. In human atherosclerotic lesions, there is a clear association between expansion of microvessels and plaque progression, both in the adventitia and the intima. Plaque microvasculature has been attributed both beneficial and detrimental contributions to atherosclerosis progression. On the one hand, plaque microvasculature has been suggested to be a means of efflux of lipids and inflammatory cells. On the other hand, plaque microvessels have been linked to influx of lipids and inflammatory cells, and show a clear association with a more instable plaque phenotype. Yet, the exact role of plaque microvasculature *in vivo* is not completely understood. Recently, also lymph vessels have been implicated in atherosclerosis development, and were shown to be increased in later stages of plaque progression. The role of plaque lymph vessels, however, is still elusive.

Therefore, the hypothesis of this thesis is that both angiogenesis and lymphangiogenesis are of key importance to atherosclerosis, and that the aberrant function of blood vessels and lymph vessels under inflammatory conditions promote atherosclerosis progression.

Our first studies (chapters 2-5) were focused on establishing functional characteristics of atherosclerotic plaque microvasculature using an *in vivo* multiphoton laser scanning microscopy (MPLSM) approach. Chapter 2 reviewed the current state of *in vivo* cardiovascular imaging using MPLSM, and discussed the benefits and shortcomings of the technique.

In chapter 3, plaque microvasculature was studied in an ApoE^{-/-} mouse model, where it was shown that plaque neovascularization was present in the outer layer of atherosclerotic blood vessels. Furthermore, it was found that only aged ApoE^{-/-} mice showed these microvessels, and that these were not present in non-atherosclerotic C57Bl/6 mice or young atherosclerotic ApoE^{-/-} mice. It was also shown that the adventitial microvessels exhibited active angiogenesis, low blood flow, increased permeability, and leukocyte adhesion and extravasation. These functional features can generally be considered pro-atherogenic features.

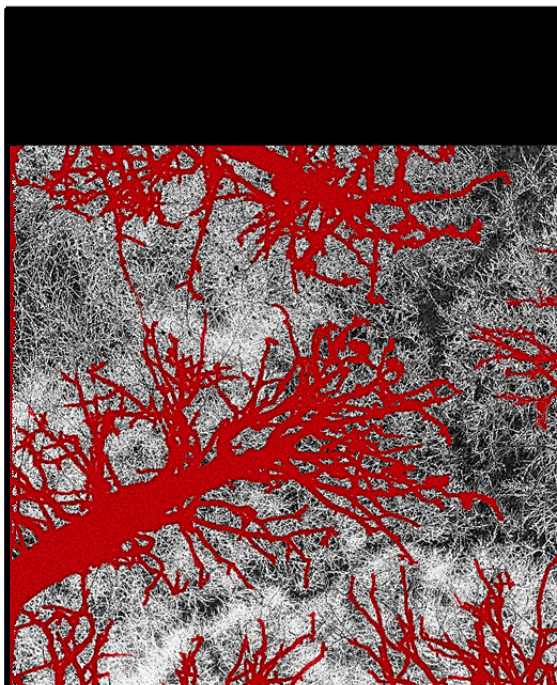
In order to explore possible causes of this leaky phenotype, we studied the function of two important endothelial junction molecules, JAM-A and VE-cadherin. In chapter 4, the role of the adhesion molecule JAM-A on endothelial permeability and leukocyte adhesion was investigated. It was shown that in arteries, JAM-A was important for adhesion and transmigration of leukocytes, and that alteration in the distribution of endothelial JAM-A induced increased leukocyte recruitment, while there was no effect on vascular permeability. Another endothelial junction molecule involved in endothelial barrier function, VE-cadherin, was studied in chapter 5. In this study, the effect of acute deterioration of the endothelial barrier function in plaque microvessels was examined. We could show that blocking VE-cadherin dimerization induced an increase in microvascular permeability and leukocyte transmigration in control microvessels. These parameters were however unchanged in plaque microvessels after VE-cadherin blocking. These findings suggested that either VE-cadherin may already be dysfunctional in adventitial microvessels and hence cannot be disrupted additionally, or alternatively are not involved in microvascular permeability in adventitial microvessels at all.

In a subsequent study in chapter 6, we sought to identify novel genetic targets involved in plaque angiogenesis and lymphangiogenesis using a genomics-based study in human atherosclerotic lesions samples. To this end, we correlated microarray data from stable and ruptured atherosclerotic plaque segments to microvessel and lymph vessel density. A set of sixteen genes and

five miRNAs were linked to plaque angiogenesis, while initial analyses were unable to uncover novel genes associated with plaque lymphangiogenesis.

With the role of lymphangiogenesis being poorly understood, we performed several intervention studies in atherosclerotic ApoE^{-/-} mice to gain a better understanding of the role of the lymphatic system in atherosclerosis. In chapter 7, we showed that removal of the lymph node draining the (atherosclerotic) carotid artery had an adverse effect on plaque progression, resulting in increased plaque size and induction of a more inflammatory phenotype with significantly increased T cell numbers. Similarly, systemic inhibition of lymphangiogenesis induced an enhanced T cell content in atherosclerotic lesions. Taken together, these data suggested a beneficial role of adventitial lymph vessels during plaque progression.

In chapter 8, the results described in this thesis and potential implications hereof were discussed and put in perspective. Also, future directions were given for further study of angiogenesis and lymphangiogenesis in atherosclerosis. In conclusion, this thesis provides new insights into the contribution of plaque angiogenesis and lymphangiogenesis to atherosclerosis progression.



Samenvatting



Hart- en vaatziekten zijn, met circa 17 miljoen sterfgevallen per jaar, één van de belangrijkste oorzaken van sterfte wereldwijd. De meest voorkomende hart- en vaatziekten zijn hartinfarcten en beroertes, die voor het overgrote deel veroorzaakt worden door het scheuren van atherosclerotische laesies.

Atherosclerose, in de volksmond beter bekend onder de naam aderverkalking, is een aandoening gekenmerkt door een chronische ontstekingsreactie in de vaatwand van de slagaders op plaatsen met een turbulent bloedstroomprofiel. Deze ontstekingsreactie ontstaat door het binnendringen van LDL cholesterol in de vaatwand doorheen de laag endotheelcellen, die de vaatwand bekleed. Na processen als oxidatie van het LDL cholesterol worden vervolgens signalen afgegeven waardoor monocytten worden aangetrokken tot de vaatwand. Na het binnendringen in de vaatwand differentiëren de monocytten tot macrofagen in een poging het geoxideerde LDL cholesterol te verwijderen uit de vaatwand. Echter, de opname van grote hoeveelheden geoxideerd LDL cholesterol door macrofagen zal ervoor zorgen dat deze veranderen in schuimcellen, die niet langer in staat zijn het LDL cholesterol af te breken. Daardoor vindt er een opstapeling plaats van schuimcellen en geoxideerd LDL cholesterol in de vaatwand. Dit is de stimulans voor een chronische ontstekingsreactie waarbij verschillende ontstekingscellen, zoals T-cellen, een rol spelen. Na verloop van tijd ontwikkelen de bovengenoemde, schuimcelrijke vroege laesies zich verder naar geavanceerde laesies. Deze laesies worden gekenmerkt door een grote kern gevuld met onder andere cholesterol en resten van dode ontstekingscellen (necrotische resten). Deze kern is omgeven door een kapsel van gladde spiercellen en bindweefsel, dat de kern gescheiden houdt van de bloedstroom. Dit kapsel is echter gevoelig voor afbraak, en zal na verloop van tijd dunner worden hetgeen leidt tot een instabiele atherosclerotische laesie. Uiteindelijk kan dit kapsel dan ook scheuren, waarbij de inhoud van de necrotische en vetrijke kern in contact komt met het bloed. Hierdoor zal er een bloedstolsel ontstaan dat een bloedvat gedeeltelijk of volledig kan afsluiten. Wanneer dit gebeurt in de kransslagaders of de halsslagaders kan dit leiden tot respectievelijk een hartinfarct of beroerte.

Tijdens de ontwikkeling van atherosclerotische laesies worden ook nieuwe kleine bloedvaatjes (microvaten) gevormd in en rond de laesie via een proces dat bekend staat als angiogenese. Het is bekend dat er in humane atherosclerotische laesies een duidelijke correlatie is tussen het

ontwikkelingsstadium waarin een laesie zich bevindt en de expansie van de microvaten in de buitenste laag van het bloedvat (de adventitia) als ook in de laesie zelf. Aan deze microvaten in en rond de laesies is zowel een positieve als negatieve rol toegeschreven. Aan de ene kant wordt gesuggereerd dat de microvaten een rol zouden kunnen spelen in het verwijderen van cholesterol en ontstekingscellen uit de laesie. Aan de andere kant zijn microvaten in de laesie juist geassocieerd met een toename van cholesterol en ontstekingscellen in de laesie. Recent is verder ook aangetoond dat lymfevatatjes in en rond de atherosclerotische laesie expanderen in verder gevorderde stadia van laesie ontwikkeling als gevolg van het proces genaamd lymfevat-angiogenese. De rol die deze lymfevatatjes spelen is nochtans onduidelijk.

Daarom hebben we in dit proefschrift getracht meer duidelijkheid te krijgen over de rol die microvaten en lymfevatatjes spelen in de ontwikkeling van atherosclerotische laesies. De hypothese behorende bij dit proefschrift is dat angiogenese en lymfevat-angiogenese een belangrijke rol hebben in de ontwikkeling van atherosclerotische laesies, en dat afwijkende functie van microvaten en lymfevaten in en rondom de laesies bijdraagt aan verdere ontwikkeling hiervan.

De eerste studies in deze thesis (hoofdstukken 2-5) zijn gefocust op het bepalen van de functionele karakteristieken van microvaten rondom atherosclerotische laesies in levende dieren (*in vivo*). Hierbij hebben we gebruik gemaakt van multifoton microscopie, een op fluorescentie gebaseerde techniek waarmee het mogelijk is *in vivo* door weefsel te scannen. Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de huidige status van *in vivo* beeldvorming met behulp van multifoton microscopie, en bespreekt de baten en tekortkomingen van deze techniek.

In hoofdstuk 3 is deze techniek vervolgens toegepast om microvaten rondom atherosclerotische laesies in een muismodel voor atherosclerose, de ApoE-deficiënte muis, te onderzoeken. Met behulp van deze techniek konden we microvaten rondom atherosclerotische laesies in beeld brengen en hieruit bleek dat deze microvaten in dit model specifiek voorkomen in muizen met gevorderde laesies, maar niet in dieren zonder laesies of met vroege laesies. Rondom de atherosclerotische laesies kon actieve vorming van nieuwe microvaten (angiogenese) worden aangetoond, en deze microvaten vertoonden een verlaagde bloedstroomsnelheid, een verhoogde permeabiliteit

(doorlaatbaarheid) en een versterkte rekrutering van ontstekingscellen in vergelijking met controle-microvaten. Deze functionele kenmerken kunnen gezien worden als bevorderend voor verdere ontwikkeling van atherosclerotische laesies.

Om een beter inzicht te krijgen in de mogelijke oorzaken van de bovengenoemde functionele kenmerken, werden hierna twee belangrijke adhesiemoleculen, die de endotheelcellen onder normale omstandigheden met elkaar verbinden, bestudeerd. In hoofdstuk 4 is gekeken naar de rol van het adhesiemolecuul JAM-A op permeabiliteit van de vaatwand en de rekrutering van ontstekingscellen. De resultaten lieten zien dat JAM-A, in ieder geval op de vaatwand van de slagaders zelf, van belang is voor adhesie van ontstekingscellen aan, en transmigratie door de vaatwand. Veranderde distributie van deze moleculen op de endotheelcellaag, zoals in atherosclerotische laesies, zorgt voor een versterkte rekrutering van ontstekingscellen. Er was geen effect op de permeabiliteit van de endotheelcellaag. In hoofdstuk 5 is vervolgens specifiek in de microvaten rondom de atherosclerotische laesies gekeken naar het molecuul VE-cadherine. Wanneer de binding van VE-cadherine tussen de endotheelcellen werd verstoord met behulp van een specifiek antilichaam, werd in controle-microvaten een versterkte permeabiliteit gemeten, als ook een versterkte transmigratie van ontstekingscellen door de vaatwand heen. Daarentegen was dit effect niet waarneembaar in microvaten rondom de atherosclerotische laesies. Deze bevindingen suggereren dat hetzij VE-cadherine al dysfunctioneel is in microvaten rondom atherosclerotische laesies en dus niet verder verstoord kan worden, hetzij VE-cadherine geen rol speelt in microvaten rondom atherosclerotische laesies.

In hoofdstuk 6 is vervolgens gekeken naar expressie van genen in humane atherosclerotische laesies in relatie tot de vorming van nieuwe microvaten en lymfevaten in de laesies. Hierbij is rekening gehouden met de veranderde expressie van genen tussen stabiele en instabiele geavanceerde laesies. Op basis van deze methode konden zestien genen en vijf micro-RNAs, betrokken bij genregulatie, gecorreleerd worden met de toename van microvaten in instabiele atherosclerotische laesies. Voor lymfevat-angiogenese konden in de eerste analyses geen genen gecorreleerd worden aan de toename van lymfevaten in instabiele atherosclerotische laesies.

Aangezien de rol van lymfevat-angiogenese in de verdere ontwikkeling van atherosclerose niet bekend is, is in hoofdstuk 7 de rol van lymfevaten in atherosclerose in het ApoE-deficiënte muismodel bestudeerd. Na het verwijderen van de lymfeknopen die verbonden zijn met de lokale lymfevaten rondom atherosclerotische laesies, kon een versterkte laesie-ontwikkeling worden waargenomen, waarbij de grootte van de laesie toenam en er een groter aantal T-lymfocyten in en rond de laesie aanwezig was. Vergelijkbare resultaten, met een toename in het aantal T-cellen rondom de laesie, werden verkregen nadat specifiek de lymfevat-angiogenese werd geremd. Deze data suggereren dat lymfevat-angiogenese in latere stadia van de ontwikkeling van atherosclerotische laesies een mogelijk remmende werking heeft.

Tot slot werden in hoofdstuk 8 de resultaten beschreven in dit proefschrift en de implicaties hiervan bediscussieerd en in perspectief geplaatst en werden opties gegeven voor verder onderzoek. Concluderend, dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de rol van angiogenese en lymfevat-angiogenese in de ontwikkeling van atherosclerose.